



TITLE:

Prevention of neointimal formation using
miRNA-126-containing nanoparticle-
conjugated stents in a rabbit model(
Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Izuhara, Masayasu

CITATION:

Izuhara, Masayasu. Prevention of neointimal formation using miRNA-126-containing nanoparticle-conjugated stents in a rabbit model. 京都大学, 2018, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2018-01-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20797>

RIGHT:

京都大学	博士（ 医 学 ）	氏 名	出 原 正 康
論文題目	Prevention of neointimal formation using miRNA-126-containing nanoparticle-conjugated stents in a rabbit model (ウサギモデルにおけるマイクロ RNA-126 含有ナノ粒子を積層したステントによる新生内膜形成の抑制効果の検討)		
(論文内容の要旨)			
<p>近年、冠動脈疾患治療には血管平滑筋細胞の増殖抑制作用を持つ薬剤溶出性ステントが用いられている。しかし、これは同時に血管内皮細胞の増殖も抑制するため、血栓症や慢性炎症を引き起こすことが問題となっている。すなわち、理想的な血管治療においては、①治療部位の血管内皮細胞を再生させ、かつ②再狭窄の主体となる平滑筋細胞の増殖を抑制することである。</p> <p>マイクロ RNA(miR)は、遺伝子発現の転写後調節因子として作用する 20 塩基程度の小さな一本鎖のノンコーディング RNA である。血管内皮細胞を誘導し、抗炎症作用を持つ miR-126 に着目し研究を開始した。その過程で、この miR-126 が直接血管平滑筋の増殖抑制も起こすことを見出し、上記の①②を同時に満たす最適なマイクロ RNA であると考え、ウサギモデルにおいて miR-126 を積層したステントの効果を検討した。</p> <p>miR-126 による治療を考えた場合、RNA オリゴヌクレオチドのみでは細胞膜の通過性が悪く、分解されやすいため、RNA に化学的な修飾を加えた。具体的には、miR-126 を元に 27 塩基 2 本鎖 RNA を作成し、細胞膜の透過性を向上させるためにコレステロールを付加し、アンチセンス鎖をホスホロチオエート化した。また、細胞内伝達性を高めるために PLGA ナノ粒子に封入した (miR-126 ナノ粒子)。</p> <p>miR-126 ナノ粒子は、濃度依存的にヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)に取り込まれ、標的遺伝子である SPRED1、PIK3R2、VCAM1 の mRNA の発現を低下させた。miR-126 ナノ粒子を取り込んだ HUVEC は増殖能及び遊走能が亢進した。次に、ウサギ大動脈から採取した血管平滑筋細胞(VSMC)における miR-126 ナノ粒子の効果を検討した。HUVEC と同様に miR-126 ナノ粒子は濃度依存的に VSMC における miR-126 発現量を増加させた。miR-126 ナノ粒子は mRNA 及びタンパクレベルで IRS-1 の発現を減少させた。in silico での標的遺伝子検索により IRS-1 遺伝子の 3' 非翻訳領域での miR-126 結合部位の配列は種を超えて保存されおり、同領域をルシフェラーゼの下流へつないで行ったルシフェラーゼアッセイにて miR-126 が IRS-1 を直接の標的遺伝子となることが示された。miR-126 ナノ粒子投与により、VSMC の増殖能及び遊走能は低下し、その VSMC の増殖能及び遊走能の抑制効果は、IRS-1 の過剰発現により打ち消された。また、IRS-1 のノックダウンによっても、VSMC の増殖能及び遊走能は低下した。次に平滑筋分化のマーカー遺伝子である、Tagln 及び Acta2 の発現量を調べたところ、miR-126 ナノ粒子によりそれらの発現量は増加した。以上より、血管平滑筋細胞においては、miR-126 は IRS-1 を抑制することで、細胞増殖及び遊走を抑制することが明らかとなった。</p> <p>次に、miR-126 ナノ粒子のステント再狭窄への効果を検討するために、ウサギ腸骨動脈モデルを用いて検討を行った。miR-126 ナノ粒子を積層したステント</p>			

<p>を作成し、ウサギ腸骨動脈に留置し、コントロール群と比較した。留置 2 8 日後に血管を取り出し、光干渉断層画像診断法で計測したところ、新生内膜面積及び新生内膜の厚さは miR-126 ナノ粒子群で有意に減少した。</p> <p>以上より、miR-126 ナノ粒子はステント再狭窄モデルにおいて、新生内膜を抑制した。内皮細胞の再生と血管平滑筋細胞の増殖および遊走の抑制が同時に起きていることが原因である可能性が考えられた。</p> <p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>血管内皮細胞を誘導し、抗炎症作用を持つ microRNA である miR-126 を積層したステントの効果をウサギステントモデルにおいて検討した。まず、RNA を局所投与可能にするために、コレステロールを付加した 2 本鎖 2 7 塩基 RNA を作成し、アンチセンス鎖をホスホロチオエート化した。また、細胞内伝達性を高めるために PLGA ナノ粒子に封入した (miR-126 ナノ粒子)。miR-126 ナノ粒子はヒト臍帯静脈内皮細胞に取り込まれ、標的遺伝子である SPRED1 の mRNA 及びタンパクの発現量を低下させ、増殖能及び遊走能を亢進させた。また、血管平滑筋細胞においては、IRS-1 を抑制することで細胞増殖及び遊走を抑制することがわかった。次に miR-126 ナノ粒子を積層したステントを作成し、ウサギ腸骨動脈に留置したところ、新生内膜面積及び新生内膜の厚さは miR-126 ナノ粒子群で有意に減少した。内皮細胞の再生と血管平滑筋細胞の増殖および遊走の抑制が同時に起きていることが原因である可能性が考えられた。</p> <p>以上の研究は、血管内皮細胞と血管平滑筋細胞における miR-126 の効果の解明に貢献し、核酸を用いた新たな動脈硬化治療に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（ 医学 ）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 2 9 年 1 1 月 1 7 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
要旨公表可能日	年	月	日